

Reagents
Plesmanlaan 125
1066 CX Amsterdam
The Netherlands
Phone: +31 20 512 3599
Fax: +31 20 512 3570
E-mail: reagents@sanquin.nl
Website: www.sanquinreagents.com

PeliCluster CD69

Réactifs monoclonaux murins anti-humains pour l'identification des cellules exprimant l'antigène CD69.

Forme	REF	Clone
PE	M2282	TP1.55.3

X0033-503fra 1112061459




1. INDICATION

Les anticorps PeliCluster sont conçus pour le diagnostic in vitro. Les réactifs identifient et énumèrent les cellules exprimant l'antigène CD sur cytomètre de flux.

Pour éviter toute interférence avec les globules rouges pendant l'analyse, le traitement du sang complet par réactif de lyse est recommandé (PeliLyse A1, numéro de commande M7101.6). Le cytomètre de flux doit être équipé pour détecter la diffusion de la lumière et la fluorescence appropriée et équipé du logiciel adéquat d'acquisition et d'analyse des données. Se référer au manuel d'utilisation de l'instrument.

Applications

Études sur l'activation des cellules et les réponses cellulaires aux stimuli mitogéniques et antigéniques.

2. COMPOSITION

Le clone TP1.55.3 a été dérivé par hybridation de cellules X63/Ag8.653 avec des cellules de rate d'une souris BALB/c immunisée avec des PBL humains activés pendant 24 heures avec des PMA et l'anticorps monoclonal anti-CD3. Ce clone appartient à une sous-classe d'IgG2b murines.

L'anticorps est conjugué à la phycoérythrine R (PE). Le rapport molaire F/P est compris entre 1,0 et 2,0.

Les anticorps ont été purifiés à partir de surnageant de culture tissulaire par chromatographie sur colonne (chromatographie d'affinité).

Ingrédients du réactif

Le réactif est fourni dans 1 ml de solution saline tamponnée au phosphate (PBS), contenant de l'ASB (0,2 % p/v) et du NaN_3 (0,1 % p/v) servant de conservateurs (voir le tableau 1).

Tableau 1. Contenu des flacons

PE	100 tests par ml dans du PBS

AVERTISSEMENT :
L'azide de sodium est nocif s'il est ingéré (R22). Conserver hors de portée des enfants (S2). Conserver à l'écart de tout aliment, boisson et aliment pour animaux (S13). Porter des vêtements de protection adaptés (S36). En cas d'ingestion, consulter immédiatement un médecin et lui montrer cette boîte ou la notice (S46). Le contact avec des acides libère un gaz très toxique (R32). Les composés d'azide doivent être éliminés avec de grandes quantités d'eau afin d'éviter des dépôts sur les conduites de plomb ou de cuivre, qui constituent des risques d'explosion.

3. CONSERVATION ET MANIPULATION

Le réactif à l'anticorps est stable jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette lorsqu'il est conservé entre 2 et 8°C. Ne pas utiliser au-delà de la date de péremption. Ne pas congeler le réactif ni l'exposer à la lumière directe lors de son stockage ou de l'incubation avec des cellules. Conserver le flacon de réactif sec.

Ne pas utiliser les réactifs en cas de signe de détérioration : augmentation de compensation ou perte importante de réactivité.

4. REACTIFS OU MATERIEL NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS

- Solution de lyse (PeliLyse, numéro de commande M7101.6).
- Tampon de lavage et de dilution pour cellules mononucléées, solution saline tamponnée au phosphate contenant 0,2 % d'ASB (p/v) ; PBS/ASB.
- Tampon de lavage et de dilution pour plaquettes,
  Tampon Sequestrine (Seq), conservation 1 mois entre 2 et 8°C. Solution mère 10 x, dissoudre dans un litre d'eau distillée :
  $Na_2HPO_4 . H_2O$: 31,3 g
  $Na_2EDTA.2H_2O$: 33,3 g
  NaCl : 90,0 g
  Avant utilisation, diluer dans de l'eau distillée, ajouter de l'ASB jusqu'à une concentration finale de 0,2 % (p/v). Mélanger et ajuster le pH à 6,8.
- Tampon de fixation, PFA/ASB (*) :
  Paraformaldéhyde 1 % dans PBS, contenant 0,2 % d'ASB (pH 7,2).
- Plaques à micropuits (96 puits, fond en V) ou tubes en plastique pour cytométrie de flux.
- Cytomètre de flux. Se référer au manuel d'utilisation de l'instrument pour plus d'informations.

(*) La procédure utilise un fixatif, le formaldéhyde. Eviter tout contact avec la peau ou les muqueuses.

5. ECHANTILLON(S)

Les échantillons de sang peuvent être préparés pour l'analyse par cytométrie de flux en utilisant des procédures de préparation de CMSP. La préparation des CMSP donne des résultats qui dépendent plus de la technique (1).

Prélever le sang de manière aseptique par ponction veineuse (1,2) dans des tubes de recueil de sang stériles K_3EDTA. Au moins 1 ml de sang complet est nécessaire pour la méthode sur sang complet et au moins 2 ml de sang complet sont nécessaires pour la préparation des CMSP. Conserver le sang anti-coagulé à température ambiante (18 à 25°C).

AVERTISSEMENT :
Considérer tous les échantillons biologiques ainsi que le matériel qui entre en contact avec eux comme présentant un risque biologique. Les échantillons doivent être manipulés comme des échantillons potentiellement infectieux (3,4) et éliminés conformément aux réglementations fédérales, d'état et locales. Ne pas pipeter à la bouche. Porter des vêtements et des gants de protection adaptés. Il a été rapporté que la fixation désactive le VIH (5).

6. PROCEDURES

A: Méthode avec cellules purifiées ficoll

1 Préparer une suspension de cellules mononucléées à une concentration de 1 x 10^7 cellules/ml.
2 Ajouter 40 µl de suspension de cellules dans des puits de microtitration ou des tubes.
3 Ajouter 10 µl de l'anticorps non dilué aux puits de microtitration ou aux tubes et mélanger doucement.
4 Incuber pendant 30 minutes entre 2 et 8°C.
5 Ajouter 150 µl de tampon aux puits de microtitration ou 2 ml de tampon aux tubes et centrifuger à 500 x g pendant 5 minutes.
6 Aspirer le surnageant du pellet de cellules et remettre les cellules en suspension.
7 Ajouter 200 µl de tampon aux puits de microtitration ou 2 ml de tampon aux tubes et centrifuger à 500 x g pendant 5 minutes.
8 Aspirer le surnageant du pellet de cellules et remettre les cellules en suspension.
9 Analyse sur cytomètre de flux :
Ajouter 200 µl de tampon aux puits de microtitration et transférer cette suspension finale de cellules dans des tubes à essai appropriés ou ajouter 200 µl de tampon dans les tubes.
10 Si l'analyse ne peut être pratiquée dans les huit heures qui suivent, ajouter 200 µl de PFA 1 % au lieu de tampon, au point 9. Sanquin Reagents recommande de pratiquer ensuite l'analyse dans les 24 heures.

B : Méthode sur sang total

1 Prélever le sang dans un tube de recueil de sang contenant de l'EDTA.
2 Verser 100 µl (*) de sang complet soigneusement mélangé au fond de chaque tube à essai.
3 Ajouter 10 µl des anticorps non dilués au fond du tube à essai et mélanger fermement pendant 30 secondes.
4 Incuber pendant 15 à 30 minutes à température ambiante.
5 Mélanger les tubes et ajouter 2 ml de solution de lyse (PeliLyse A1, diluée 10 x).
6 Incuber pendant 10 à 15 minutes à température ambiante jusqu'à ce que la lyse soit terminée.
7 Analyser les échantillons dans les 90 minutes qui suivent.

Si l'analyse ne peut être effectuée dans les 90 minutes, centrifuger les tubes à 500 x g pendant 5 minutes. Aspirer le surnageant du pellet de cellules et remettre les cellules en suspension dans 1 ml de tampon pour une analyse dans les 8 heures ou dans 1 ml de PFA à 1 %. Sanquin Reagents recommande de pratiquer ensuite l'analyse dans les 24 heures.

* Cette méthode a été mise au point pour les échantillons sanguins présentant une numération leucocytaire normale et en utilisant PeliLyse A1 (solution de lyse, numéro de référence M7101.6). Il peut être nécessaire d'ajuster la quantité de sang pour des échantillons présentant une numération leucocytaire très élevée ou très basse.

C: Cytométrie de flux et microscopie de la membrane plaquettaire.

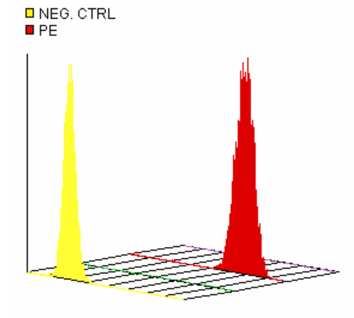
1. Transférer 45 µl de suspension plaquettaire (1 x 10^8 cellules/ml) sur la plaque à micropuits ou dans des tubes puis ajouter 5 µl d'anticorps monoclonal*. Mélanger doucement puis incuber pendant 30 minutes entre 2 et 8 °C.
2. Rincer en mélangeant puis en ajoutant un tampon Sequestrine (Seq) à la plaque à micropuits (150 µl au premier lavage, 200 µl au second) ou aux tubes (2 ml). Centrifuger à 1000 x g pendant 5 minutes, aspirer le surnageant puis renouveler une fois cette procédure.
3. Préparer les cellules pour l'analyse :
Pour la cytométrie de flux, remettre les cellules en suspension en ajoutant 200 µl de Seq à la plaque à micropuits ou aux tubes. En cas d'utilisation d'une plaque à micropuits, le contenu est transféré dans des tubes appropriés.
Pour une microscopie à fluorescence, remettre les cellules en suspension dans 50 µl de produit d'inclusion, transférer les cellules sur une lame de microscope puis déposer une lame de protection.

* En règle générale, il est possible d'utiliser 5 µl d'anticorps monoclonal non dilué. Alternativement, il est possible de déterminer une dilution optimale. Il est nécessaire de toujours utiliser un contrôle négatif de même isotype pour déterminer la fluorescence d'arrière-plan.

Résultats de l'analyse
Dans le cadre de certaines maladies, on peut s'attendre à observer des nombres anormaux de cellules exprimant cet antigène ou des niveaux d'expression aberrants de cet antigène. Il est important de comprendre le schéma d'expression normal de cet antigène et sa relation avec l'expression d'autres antigènes pertinents afin de réaliser une analyse adéquate.

Cytométrie de flux
Agiter les cellules soigneusement à faible vitesse pour limiter l'agrégation avant de faire passer les cellules sur le cytomètre de flux (6). Acquérir et analyser les données en mode liste à l'aide d'un logiciel approprié. Avant l'acquisition des échantillons, ajuster le seuil pour minimiser les débris et assurer que les populations concernées sont incluses. La figure 1 présente des données représentatives obtenues sur des lymphocytes triés. Excitation du laser à 488 nm.

Fig. 1. Profil de fluorescence, canaux de dispersion réglés sur la fraction lymphocytaire (R1)



REMARQUE : Un réglage incorrect du canal sur les données d'échantillon peut donner des résultats incorrects.

Contrôle de qualité interne
L'utilisation d'un contrôle négatif (consulter le catalogue de Sanquin Reagents) est recommandée afin de déterminer la fluorescence d'arrière-plan produite en raison des capacités de liaison de Fc par les cellules mononucléées.
La concentration et le rapport F/P de ces contrôles ont été ajustés selon les anticorps monoclonaux conjugués de Sanquin Reagents.

7. PERFORMANCES

Spécificité
L'anticorps monoclonal est dirigé contre l'antigène CD69 qui est exprimé principalement sur une sous-population de thymocytes et de plaquettes. La molécule CD69 (également appelée molécule inductrice d'activation, AIM) est un homodimère de 27 à 33 kDa avec liaison de disulfure phosphorylée, composé de sous-unités glycosylées différemment. CD69 est une protéine membranaire intégrale de type II avec un domaine de lectine de type C extracellulaire. Après activation in vitro des lymphocytes T, des cellules NK et des lymphocytes B, CD69 est la première glycoprotéine de surface inductible qui apparaît. CD69 est impliqué dans la transduction de signal lors des premières étapes de l'activation des cellules. CD69 est indétectable sur la plupart des lymphocytes de sang périphérique. Les lymphocytes T au repos n'expriment pas CD69, mais son expression peut être rapidement induite en déclenchant le complexe TCR/CD3. La majorité des cellules NK de sang périphérique sont négatives pour CD69 ; en revanche, elles expriment l'AIM peu après l'activation avec des PMA, IL-2, l'interféron alfa ou l'anticorps monoclonal CD16. CD69 agit comme une molécule de déclenchement dans les cellules NK et les plaquettes. TP1.55.3 réagit avec lymphocytes T activés mais a peu ou pas d'effet sur l'induction de la prolifération de lymphocytes T et la production d'IL-2. Cet anticorps monoclonal immunoprécipite l'homodimère de 60 kDa et les sous-unités de 27 kDa et 33 kDa à partir de PBL activés (avec des PMA et de l'anticorps monoclonal anti-CD3) respectivement dans des conditions réductrices et non-réductrices (7-11).

Sensibilité
La sensibilité est définie comme une distinction entre la population CD négative et la population CD positive différente. La sensibilité a été mesurée en évaluant plusieurs concentrations d'anticorps. Chaque concentration a été testée sur du sang complet. La séparation des populations CD positives des populations CD négatives a été déterminée à partir de chaque échantillon et une moyenne a été calculée pour chaque concentration. La concentration d'anticorps en flacon pour chaque réactif a fourni une sensibilité optimale pour la distinction entre les cellules CD positives et les cellules CD négatives.

Reproductibilité/Répétabilité.
Les CD ont été soumis à l'un des Ateliers internationaux sur les antigènes de différenciation des leucocytes humains (International Workshops on Human Leukocyte Differentiation Antigens) ou remplissent les spécifications de l'atelier (voir composition).

Pour déterminer la répétabilité de la coloration avec chaque réactif, les échantillons ont été colorés avec plusieurs lots de réactifs. Les différents échantillons utilisés pour l'évaluation ont donné une valeur d'intensité de fluorescence moyenne présentée dans le tableau 2. Pour chaque échantillon, deux lots différents de réactifs ont généré une paire de résultats. Les écarts type individuels ont été déterminés à partir des résultats groupés en paire de chaque échantillon. Les écarts type ont été combinés pour dériver un écart type groupé pour chaque réactif qui fournit une estimation de la reproductibilité intra-échantillon.

Tableau 2. **Répétabilité de l'intensité de fluorescence moyenne de cellules cibles dans des lots différents (N) et pour des donneurs multiples**

	N.*	Intensité de fluorescence moyenne	Ecart type groupé	CV % groupé
PE	2	382.9	98.3	25.7%

* N = nombre d'échantillons

8. LIMITES

Les conjugués avec des fluorochromes plus brillants (PE, PE-Cy5) donnent une séparation plus importante que les conjugués avec d'autres colorants (FITC). Lorsque les populations se chevauchent, le calcul du pourcentage positif pour les marqueurs peut être affecté par le choix du fluorochrome.

L'utilisation d'anticorps monoclonaux dans le cadre du traitement du patient peut interférer avec la reconnaissance d'antigènes cible par ce réactif. Cela doit être pris en compte lors de l'analyse d'échantillons de patients traités de cette manière. Sanquin Reagents n'a pas caractérisé l'effet de la présence d'anticorps thérapeutiques sur les performances de ce réactif.

Les réactifs uniques ne peuvent fournir que des informations limitées pour l'analyse des leucémies et des lymphomes. L'utilisation d'associations d'autres réactifs et l'application d'autres procédures diagnostiques peuvent fournir plus d'informations que l'utilisation de ces réactifs uniquement. L'analyse multicolore utilisant des associations adéquates de réactifs est fortement recommandée.

Comme les réactifs peuvent être utilisés dans différentes associations, les laboratoires doivent se familiariser avec les propriétés de chaque anticorps en association avec d'autres marqueurs dans des échantillons normaux et anormaux.

Les performances des réactifs ont été classiquement évaluées sur sang traité à l'EDTA. Les performances des réactifs peuvent être affectées par l'utilisation d'autres anticoagulants.

DEPANNAGE

Problème	Cause possible	Solution
Faible distinction entre les débris et les lymphocytes	Interaction avec d'autres cellules et avec les plaquettes	Préparer et colorer un autre échantillon.
	Mauvaise manipulation de la préparation de cellules	Vérifier la viabilité des cellules ; centrifuger les cellules à une vitesse plus faible.
	Réglage inadéquat de l'instrument	Respecter les procédures de réglage de l'instrument ; optimiser les réglages de l'instrument selon les besoins.
Coloration faible ou diminuant	Concentration de cellules trop forte lors de l'étape de coloration	Vérifier et ajuster la concentration de cellules ou le volume de l'échantillon ; colorer avec de l'échantillon frais
	Quantité insuffisante de réactif	Refaire la coloration en utilisant une quantité plus importante d'anticorps.
	Cellules non analysées dans les 8 heures suivant la coloration	Répéter la coloration avec de l'échantillon frais ; analyser rapidement.
	Préparation incorrecte du milieu (oubli du conservateur)	Utiliser du conservateur dans le milieu de coloration et lors des étapes de lavage.
Peu ou pas de cellules	Concentration de cellules trop faible	Remettre en suspension de l'échantillon frais à une concentration plus élevée ; refaire la coloration et l'analyse.
	Mauvais fonctionnement du cytomètre	Dépanner l'instrument.

BIBLIOGRAPHIE

1 *Clinical Applications of Flow Cytometry: Quality Assurance and Immunophenotyping of Lymphocytes; Approved Guideline.* Wayne PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards;1998. NCCLS document H42-A.

2 *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture, Fourth Edition;Approved Standard.* Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1998. NCCLS document H3-A4.

3 *Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids and Tissue: Tentative Guideline.* Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1991. NCCLS document M29-T2.

4 Centers for Disease Control. Update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. MMWR. 1988;37;377-388.

5 Nicholson JK, Browning SW, Orloff SL, McDougal JS. Inactivation of HIV-infected H9 cells in whole blood preparations by lysing/fixing reagents used in flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1993;160:215-218.

6 Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. Rose NR, Friedman H, Fahey JL eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC; American Society for Microbiology; 1986:226-235.

7 Lopez-Cabrera, M., Santis, A.G., Fernandez-Ruiz, E., Sanchez-Mateos, P., Sanchez-Madrid, F., et al., Schlossman, S.F. (editor) et al., *Leucocyte Typing V, Oxford University Press*, 1133-1136, (1995).

8 Cebrian, M., Yagüe, E., Rincon, M., Lopez-Bodet, M., de Landazuri, M.O., Sanchez-Madrid, F., *J. Exp. Med*. 168 1621-1637 (1988).

9 Borrego, F., Galiani, M.D., Garcia-Cozar, F., Madueno, J.A., Perez-Bermejo, L., Santamaria, M., Pena, J., Solana, R., et al., Schlossman, S.F. (editor) et al., *Leucocyte Typing V, Oxford University Press*, 1133-1136, (1995).

10 Testti, R., Pulcinelli, F., Frati, L., Gazzaniga, P.P., Santoni, A., *J. Exp. Med*. 172, 701-707, (1990).

11 Testi, R., d'Ambrosio, D., de Maria, R., Santoni, A., *Immunol. Today*, 15, 479-483, (1994).